

平成22年5月20日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380149
 研究課題名（和文）アミノ酸の筋肉蛋白質合成特異的促進能力を応用した
 飼料アミノ酸要求量の精密化
 研究課題名（英文）Accurate estimation of amino acid requirement using the potency
 of specific amino acids to stimulate muscle protein synthesis
 研究代表者
 喜多 一美（KITA KAZUMI）
 岩手大学・農学部・教授
 研究者番号：20221913

研究成果の概要（和文）：ニワトリ胚筋芽細胞を用いて単一アミノ酸欠乏の影響を調べたところ、バリン及びメチオニンは筋肉蛋白質合成を刺激することが見出された。バリンは、筋肉細胞のインスリン様成長因子タイプ1レセプターの遺伝子発現を上昇させることにより蛋白質合成を促進していた。しかし、飼料へのバリン添加はニワトリの成長を促進しなかった。飼料を低蛋白質化し、メチオニンとグリシンを同時に添加したところブロイラーの飼料効率が改善された。

研究成果の概要（英文）：It was found that valine and methionine stimulated protein synthesis when chicken embryo myoblasts were incubated in single amino acid deficient medium. Valine stimulated protein synthesis with elevation of gene expression of insulin-like growth factor type-1 receptor. However, dietary valine supplementation did not improve growth performance of chickens. Supplementation of both methionine and glycine in a low-protein diet improved feed efficiency of broilers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	10,800,000	3,240,000	14,040,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：ニワトリ、筋芽細胞、タンパク質合成、アミノ酸、バリン、メチオニン、グリシン、インスリン様成長因子

1. 研究開始当初の背景

申請者は今までに、食品製造副産物などの未利用資源を家畜・家禽の飼料原料として活用する研究や、様々な飼料添加物が家畜・家禽の畜産物生産機能に及ぼす影響について研究を進めてきた。また、ニワトリを用いて、

主要な畜産物の一つである肉の生産性の向上を最終的な目的とし、産肉性制御の指標となりうる筋肉タンパク質合成速度と栄養条件との関係について一連の研究を進めてきた。その中で、飼料タンパク質含量が欠乏状態から要求量まで増加すると、体全体のタン

パク質合成速度及び筋肉のタンパク質合成速度が上昇し、飼料タンパク質含量が要求量を超えると、体全体のタンパク質合成速度及び筋肉のタンパク質合成速度は低下することを明らかにした。さらに、飼料エネルギー含量や5大栄養素が、体全体や筋肉のタンパク質合成速度に及ぼす影響について調査し、絶食により低下した筋肉タンパク質合成速度は、再給餌された飼料中に含まれるタンパク質および炭水化物により再び上昇することを明らかにした。

ここまでの研究成果から、飼料エネルギー含量や飼料中のタンパク質及び炭水化物含量の違いがニワトリの筋肉タンパク質合成に影響を及ぼすことが明らかになった。ここで、タンパク質や炭水化物は、消化管内でグルコースやアミノ酸のような低分子化合物に消化されて吸収されることから、栄養素摂取に伴う筋肉タンパク質合成速度の制御機構を解明するためには、アミノ酸のような低分子化合物による影響を調査することが必要となった。最近では、分岐鎖アミノ酸の一つであるロイシンが筋肉タンパク質合成促進機能を有することが明らかにされ、その分子機構も解明されつつある。

申請者は、*in vivo*におけるニワトリの筋肉タンパク質合成速度の調節機構のみならず、ニワトリ胚筋芽細胞の *in vitro* 培養系を用い、アミノ酸による筋肉タンパク質合成速度の調節機構についても研究を進めてきた。そこで、アミノ酸による新たな特異的タンパク質合成促進作用を見出し、血中あるいは筋肉中のアミノ酸濃度を制御することにより、今まで以上に筋肉タンパク質合成を高めることが期待された。

2. 研究の目的

本研究では、筋肉タンパク質合成特異的促進能力を有するアミノ酸を見出すとともに、それらのアミノ酸が有効的に作用する飼料を調製し、飼料効率の改善を通して窒素排泄量の低減ができるような低タンパク質飼料を開発することを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 単一アミノ酸欠乏がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

ニワトリの受精卵を14日間孵卵し、胚の浅胸筋をトリプシン消化して筋芽細胞を採取した。筋芽細胞はコラーゲンコート

48-well プレート上で培養した。培養液には **Medium 199** を用い、体タンパク質を構成する20種類のアミノ酸の内、1種類のアミノ酸を欠乏させた。タンパク質合成は、培養液中にトレーサーとして加えた ^3H -フェニルアラニンの細胞タンパク質への取り込み量を指標とした。

(2) 単一アミノ酸欠乏及びウシ胎児血清(FCS)がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

(1)と同様にニワトリ胚筋芽細胞を調製した。培養液には **Medium 199** を用い、体タンパク質を構成する20種類のアミノ酸の内、1種類のアミノ酸を欠乏させた。同時に、培養液にウシ胎児血清(FCS)を添加する区と添加しない区を設け、培養液中のFCS濃度は1%とした。タンパク質合成は、細胞タンパク質への ^3H -フェニルアラニンの取り込み量を指標とした。

(3) 単一アミノ酸欠乏及びインスリン様成長因子-I(IGF-I)がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

(1)と同様にニワトリ胚筋芽細胞を調製した。培養液には **Medium 199** を用い、体タンパク質を構成する20種類のアミノ酸の内、1種類のアミノ酸を欠乏させた。同時に、培養液にIGF-Iを添加する区と添加しない区を設け、培養液中のIGF-I濃度は $20\mu\text{g/mL}$ とした。タンパク質合成は、細胞タンパク質への ^3H -フェニルアラニンの取り込み量を指標とした。

(4) バリン欠乏がニワトリ胚筋芽細胞のインスリン様成長因子(IGF)タイプ1レセプター遺伝子発現に及ぼす影響

(1)と同様にニワトリ胚筋芽細胞を調製した。培養液には **Medium 199** を用い、単一アミノ酸(ロイシン、バリン、チロシン)を欠乏させた培養液で培養し、IGFタイプ1遺伝子の発現量をリアルタイムPCRにより比較した。

(5) バリン過剰飼料給与がニワトリの成長に及ぼす影響

単冠白色レグホン種雄初生ヒナを市販飼料にて育雛し、10日齢から10日間バリン2%過剰飼料を給与した。実験最終日に体重を測

定した。また、血清を採取し、アミノ酸濃度を測定した。

(6) メチオニンの過剰がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

(1)と同様にニワトリ胚筋芽細胞を調製した。培養液には Medium 199 を用いた。Medium 199 中のアミノ酸濃度を基準とし、メチオニン濃度を 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍と変化させた。タンパク質合成は、細胞タンパク質への³H-フェニルアラニンの取り込み量を指標とした。

(7) ホモシスチンまたはシステインの過剰がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

(1)と同様にニワトリ胚筋芽細胞を調製した。培養液には Medium 199 を用いた。Medium 199 中のアミノ酸濃度を基準とし、ホモシスチンまたはシステイン濃度を 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍と変化させた。タンパク質合成は、細胞タンパク質への³H-フェニルアラニンの取り込み量を指標とした。

(8) メチオニン及びグリシンの過剰がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

(1)と同様にニワトリ胚筋芽細胞を調製した。培養液には Medium 199 を用いた。Medium 199 中のアミノ酸濃度を基準とし、メチオニン濃度 1 倍、4 倍、グリシン濃度を 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍と変化させ 2×4 の 8 処理区を設けた。タンパク質合成は、細胞タンパク質への³H-フェニルアラニンの取り込み量を指標とした。

(9) メチオニン代謝産物及びグリシンの過剰がニワトリ胚筋芽細胞のメチオニン代謝関連酵素遺伝子発現に及ぼす影響

(1)と同様にニワトリ胚筋芽細胞を調製した。培養液には Medium 199 を用いた。Medium 199 中のアミノ酸濃度を基準とし、メチオニン代謝産物濃度及びグリシン濃度を 1 倍及び 4 倍と変化させ 2×2 の 4 処理区を設けた。メチオニン代謝関連酵素としてメチオニンアデノシルトランスフェラーゼ、S-アデノシルホモシスチンヒドロラーゼ、シスタチオン-β-シンターゼ、シスタチオン-γ-リアーゼに着目した。筋芽細胞から総

RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いてメチオニン代謝関連酵素遺伝子発現を測定した。なお、酵素の遺伝子発現はリボソームタンパク質 S17 遺伝子発現との相対値で表した。

(10) 低タンパク質飼料へのメチオニン及びグリシン添加が仕上げ期ブロイラーの成長に及ぼす影響

4 週齢のブロイラー雄を市販飼料にて 1 週間予備飼育した。5 週齢から 2 週間メチオニン及びグリシンを添加した低タンパク質飼料を供与した。試験最終日に増体量と飼料摂取量を測定し飼料効率を求めた。

4. 研究成果

(1) 単一アミノ酸欠乏がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

全てのアミノ酸を含む培養液と比較して、アルギニン、シスチン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、スレオニン、バリンの欠乏はタンパク質合成を有意に低下させた。アルギニン及びバリンの欠乏による筋芽細胞タンパク質合成の低下は、他のアミノ酸欠乏と比べて著しかった (図 1)。

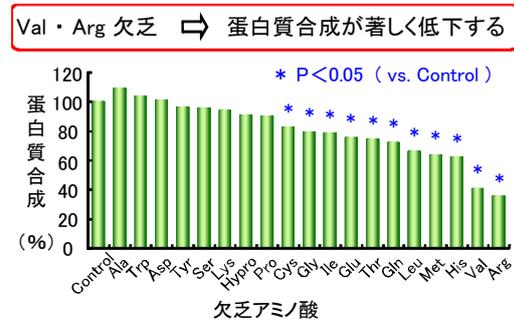


図1. 単一アミノ酸欠乏がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

(2) 単一アミノ酸欠乏及びウシ胎児血清 (FCS) がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

FCS の添加により、多くの処理区でタンパク質合成が上昇した。しかし、バリン及び数種類のアミノ酸 (アラニン、アルギニン、シスチン、グルタミン、イソロイシン) の単一欠乏培養液では、FCS によるタンパク質合成促進効果が認められなかった (図 2)。

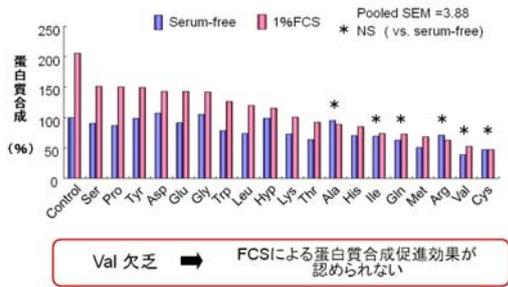


図2. 単一アミノ酸欠乏およびウシ胎児血清FCSが筋芽細胞の蛋白質合成に及ぼす影響

(3) 単一アミノ酸欠乏及びインスリン様成長因子-I (IGF-I) がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

IGF-I の添加により、バリンまたはメチオニンが欠乏している培養液以外、タンパク質合成が 1.2 倍から 1.9 倍増加した。しかし、バリンまたはメチオニンが欠乏している培養液を用いた筋芽細胞では、IGF-I によるタンパク質合成促進効果が認められなかった (図3)。

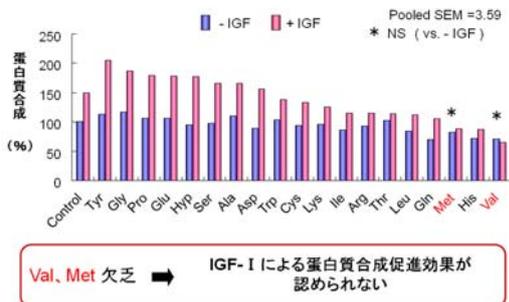


図3. 単一アミノ酸欠乏及びIGF-I が筋芽細胞の蛋白質合成に及ぼす影響

(4) バリン欠乏がニワトリ胚筋芽細胞のインスリン様成長因子 (IGF) タイプ 1 レセプター遺伝子発現に及ぼす影響

培養液中の FCS 濃度が 10% の時、培養液からロイシン又はチロシンを欠乏させると IGF type-1 レセプターの遺伝子発現は対象区の半分まで低下した。培養液中の FCS 濃度が 1% または 0% になると IGF type-1 レセプターの遺伝子発現は FCS10% の場合と比較して低下した。培養液中のバリン欠乏は、FCS 濃度の違いにかかわらず IGF type-1 レセプターの遺伝子発現を著しく低下させた (図4)。

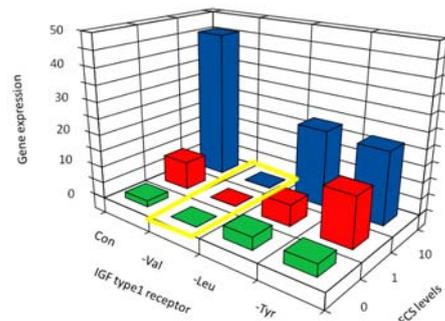


図4. 単一アミノ酸(バリン、ロイシン、チロシン)欠乏が筋芽細胞のIGF type 1レセプター遺伝子発現に及ぼす影響

(5) バリン過剰飼料給与がニワトリの成長に及ぼす影響

バリン 2%過剰飼料を給与されたニワトリの血中バリン濃度は対照ヒナと比較して有意に上昇したが、体重増加量に差は認められなかった (図5)。

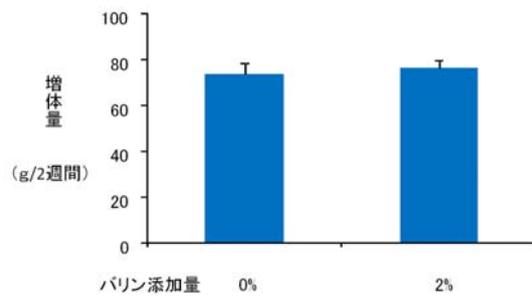


図5. 飼料へのバリン添加がニワトリヒナの成長に及ぼす影響

(6) メチオニンの過剰がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

培養液中のメチオニン濃度を 3 倍以上にすると筋芽細胞のタンパク質合成はメチオニン濃度の上昇に伴って低下した (図6)。

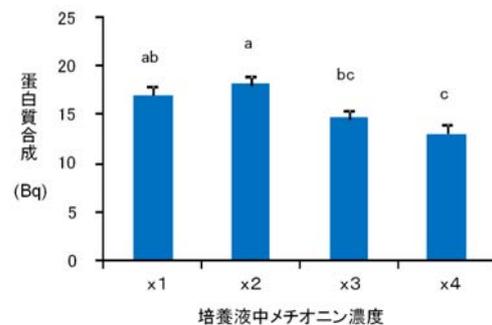


図6. 培養液中のメチオニンの過剰が筋芽細胞の蛋白質合成に及ぼす影響

(7) ホモシスチンまたはシステインの過剰がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

体内に吸収されたメチオニンは、S-アデノシルメチオニン、S-アデノシルホモシスチン、ホモシスチン、シスタチオニン、システインと代謝されることから、メチオニン過剰障害の原因としてメチオニン代謝産物（ホモシスチン、システイン）の関与が考えられた。

培養液中のホモシスチンあるいはシステイン濃度を1倍（コントロール）、2倍、3倍、4倍と増加させたところ、ニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成はホモシスチンまたはシステイン濃度の上昇に伴って低下した（図7）。

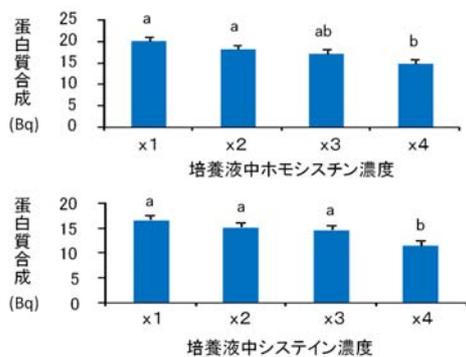


図7. 培養液中のホモシスチンまたはシステインの過剰が筋芽細胞の蛋白質合成に及ぼす影響

(8) メチオニン及びグリシンの過剰がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

培養液中のメチオニン濃度を4倍に増加したところ、ニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成は低下した。また、同時にグリシンを2倍、3倍、4倍と過剰にしたところ、メチオニン濃度が4倍の時にグリシン濃度の上昇に伴って蛋白質合成は低下した（図8）。

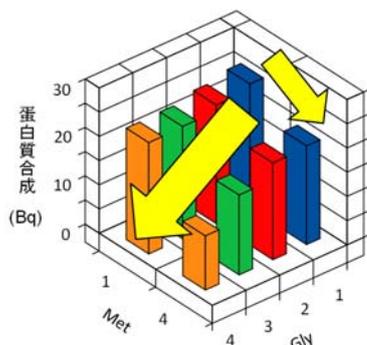


図8. 培養液中のメチオニン及びグリシンの過剰が筋芽細胞の蛋白質合成に及ぼす影響

(9) メチオニン代謝産物及びグリシンの過剰がニワトリ胚筋芽細胞のメチオニン代謝関連酵素遺伝子発現に及ぼす影響

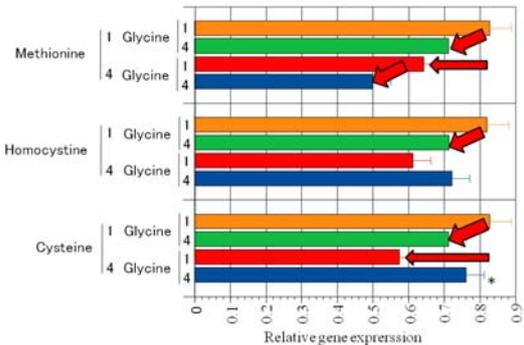


図9. 培養液中のメチオニン及びシステイン過剰がニワトリ胚筋芽細胞のメチオニンアデノシルトランスフェラーゼ遺伝子発現に及ぼす影響

体内に吸収されたメチオニンは、S-アデノシルメチオニン、S-アデノシルホモシスチン、ホモシスチン、シスタチオニン、システインと代謝され、メチオニン代謝産物であるホモシスチンやシステインの過剰も筋肉タンパク質合成を低下させる。そこで、メチオニン代謝に関与する酵素の遺伝子発現に対するメチオニン代謝産物とグリシンの相互作用を調べたところ、メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ遺伝子発現に対して、システインとグリシンの間に有意な交互作用が認められた。しかし、メチオニン及びホモシスチンとグリシンの間には交互作用は認められなかった。メチオニン及びシステイン過剰は、メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ遺伝子発現を減少させた。しかし、システイン過剰時においてグリシン添加は遺伝子発現量を上昇させた（図9）。

全てのメチオニン代謝産物とグリシンの間において、S-アデノシルホモシスチンヒドロラーゼ遺伝子発現に対して交互作用が認められた。メチオニン代謝産物濃度が正常であると、グリシン添加によりS-アデノシルホモシスチンヒドロラーゼ遺伝子発現は低下した。また、グリシン濃度が正常時において、メチオニン過剰及びシステイン過剰により遺伝子発現量が減少した。またグリシン添加時において、ホモシスチン濃度の上昇が遺伝子発現を促進した。

シスタチオニン-β-シターゼは、メチオニン代謝産物過剰により遺伝子発現量が増加することが示された。シスタチオニン-γ-リアーゼ遺伝子発現に対して、システインとグリシンの有意な交互作用が認められ、システイン過剰時の発現量がグリシン添加により増加した。

- (10) 低タンパク質飼料へのメチオニン及びグリシン添加が仕上げ期ブロイラーの成長に及ぼす影響

低タンパク質飼料にメチオニンとグリシンを同時に添加したところ、仕上げ期のブロイラーの飼料効率が改善された(図10)。

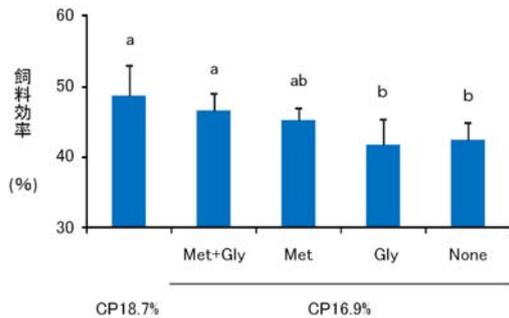


図10. 低タンパク質飼料へのメチオニン及びグリシン添加がブロイラーの飼料効率に及ぼす影響

<まとめ>

ニワトリ胚筋芽細胞を用いて単一アミノ酸欠乏の影響を調べたところ、バリン及びメチオニンが特異的に筋肉タンパク質合成を促進することを見出した。次に、バリンによる筋肉タンパク質合成促進機構の解明に着手し、バリンは筋肉細胞のIGFタイプ1レセプター遺伝子発現を高進することにより血中IGF-Iによる蛋白質合成促進効果を発揮させていることを明らかにした。しかし、バリンによるIGFタイプ1レセプター遺伝子発現の高進を期待し、ニワトリ飼料へバリンを過剰に添加したが成長は促進されなかった。

次に、メチオニンによる筋肉タンパク質合成の促進を目指したが、メチオニン過剰は筋芽細胞の蛋白質合成を低下させ、この過剰障害を緩和するというグリシンを添加しても改善されなかった。しかし、飼料を低タンパク質化した上でメチオニンとグリシンを同時に添加したところブロイラーの飼料効率が改善されたことから、飼料効率の改善を通して窒素排泄量の低減ができるような低タンパク質飼料の開発は可能であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Nagao, K., Hiramatsu, K., Tsukada, A. and Kita, K. Effects of Insufficient Levels of Dietary Protein on IGF-I and IGF-BPs in

Young Chickens. Journal of Poultry Science Journal、査読有、Vol. 47、2010、印刷中

[学会発表] (計7件)

- ① 喜多一美・古屋雄一朗・高木 智・藤條武司、メチオニン過剰がニワトリ胚筋芽細胞の蛋白質合成に及ぼす影響、日本家禽学、2009.9.26、琉球大学(沖縄県)
- ② 喜多一美・川島淑美・生魚利治・藤村忍、トリプトファン過剰飼料給与がニワトリの血中トリプトファン-グルコース化合物濃度に及ぼす影響、日本畜産学会第110回大会、2009.3.29、日本大学(神奈川県)
- ③ 喜多一美・大木麻衣、電気泳動により抽出したトリプトファン-グルコース化合物がニワトリ胚腎臓細胞の蛋白質合成に及ぼす影響、日本畜産学会第109回大会、2008.3.29、常磐大学(茨城県)
- ④ 古屋雄一朗・喜多一美、ニワトリ胚筋芽細胞においてアミノ酸欠乏が蛋白質合成及び成長促進因子の遺伝子発現へ及ぼす影響、日本家禽学会第2008年度春季大会、2008.3.28、常磐大学(茨城県)
- ⑤ 古屋雄一朗・喜多一美、蛋白質分解ともなうニワトリ胚筋芽細胞のアミノ酸プールの経時的变化、日本家禽学会第2007年度秋季大会、2007.9.28、岡山大学(岡山県)
- ⑥ 喜多一美・大木麻衣、トリプトファン-グルコース化合物がニワトリ胚由来筋芽細胞及び腎臓細胞の蛋白質合成に及ぼす影響、日本畜産学会第108回大会2007.9.27、岡山大学(岡山県)
- ⑦ 古屋雄一朗・喜多一美、ニワトリ胚筋芽細胞におけるアミノ酸プールの経時的变化、日本畜産学会第108回大会、2007.9.26、岡山大学(岡山県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜多一美 (KITA KAZUMI)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：20221913

(2) 研究分担者

藤村忍 (FUJIMURA SHINOBU)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号：20282999